

明 細 書
KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA

技術分野

5 本発明は、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAに関する。

背景技術

クルッペル様因子 (Kruppel-like factor、以下KLFと略す) ファミリーは、C末端のジンク・フィンガー (zinc finger) モチーフを特徴とする、転写因子のファミリーであり、KLF1、KLF2、KLF3、KLF4、KLF5、KLF6、KLF7、KLF8、KLF9、KLF10、KLF11、KLF12、KLF13、KLF14、KLF15、KLF16等が知られている。哺乳類において、KLFファミリーは、様々な組織や細胞、例えば赤血球、血管内皮細胞、平滑筋、皮膚、リンパ球等の分化に重要であること、また癌、心血管疾患、肝硬変、腎疾患、免疫疾患等の各種疾患の病態形成に重要な役割を果たしていることが報告されている (J. Biol. Chem., 276, 34355-34358, 2001; Genome Biol., 4, 206, 2003)。

KLFファミリーのうちのKLF5は、BTEB2 (basic transcriptional element binding protein 2) あるいはIKLF (intestinal-enriched Kruppel-like factor) ともよばれる。血管平滑筋におけるKLF5の発現は、発生段階で制御を受けており、胎児の血管平滑筋では、高い発現を示すのに対し、正常な成人の血管平滑筋では発現が見られなくなる。また、バルーンカテーテルによる剝離後に新生した血管内膜の平滑筋では、KLF5の高い発現がみられ、動脈硬化や再狭窄の病変部の平滑筋でもKLF5の発現がみられる (Circulation, 102, 2528-2534, 2000)。

動脈硬化巣や経皮的冠動脈形成術後の再狭窄部位などの病変部位の血管平滑筋は、活性化しており、筋フィラメントの消失、蛋白合成の亢進、増殖能や遊走能を示し、胎児の血管平滑筋と同様の形質 (胎児型) へ形質転換している。平滑筋細胞にはSM1、SM2、SMembという3種類のミオシン重鎖のアイソフォームが存在するが、胎児型への形質転換に伴い、SM2が消失し、SMembの発現誘導が認められる。KLF5は、SMemb遺伝子の転写制御配列と結合し、その転写を活性化する (非特許文献4参照)。さらに、血小板由来増殖因子A鎖 (以下PDGF-Aとよぶ)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) - β 、血管内皮増殖因子 (VEGF) リセプター、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター (PAI) -1および転写因子 Egr (early growth response) -1など、血管の形質や血管新生に関与する遺伝子の転写を活性化することが報告されている (Nat. Med., 8, 856-863, 2002; Ann. N. Y. Acad. Sci., 947, 56-66, 2001)。

また、KLF5遺伝子のヘテロノックアウトマウスにおいて、心血管系への物理的負荷やアンジオテンシンIIにより引き起こされる血管平滑筋増殖と血管内膜肥厚、血管新生、血管外膜の肉芽形成、心肥大および心筋線維化等が著明に抑制されていることが報告されている (Nat. Med., 8, 856-863, 2002)。

このように、KLF5遺伝子は平滑筋形質変換に関わるだけでなく、広く心血管系の病態形成に関わる転写因子であり、その機能発現には遺伝子発現量がきわめて重要

である。KLF5は、動脈硬化や、心肥大等の心血管系の疾患あるいは癌等の血管新生が関与する疾患の病態形成に関与するので、KLF5遺伝子の発現を抑制することでこれらの疾患の治療または予防に有用な薬剤となりうることが予想される。しかし、現在のところKLFファミリー遺伝子の発現を効果的に抑制する薬剤は知られていない。

5 一方、RNA干渉 (RNA interference、以下、RNAiとよぶ) は、線虫において標的とする遺伝子と同一の配列を有する二本鎖RNAを導入することにより、標的遺伝子の発現が特異的に抑制される現象として報告された (Nature, 391, 806-811, 1998)。

RNAiは、導入した二本鎖RNAが、21~23塩基の長さの二本鎖RNAに分解された後、蛋白質複合体がこの短い二本鎖RNAと結合し、同じ配列を有するmRNAを認識し切断することによって起こると考えられている。Tuschlらは、ショウジョウバエにおいて長い二本鎖RNAの代わりに、21~23塩基の長さの二本鎖RNAを導入することによっても、標的遺伝子の発現が抑制されることを見だし、これをshort interfering RNA (siRNA)と名づけた (WO 01/75164)。siRNAの配列と標的遺伝子とのミスマッチがあると非常に発現抑制の効果が弱まること、長さは21塩基が最も効果が高く、平滑末端よりも、両方の鎖の3'末端にヌクレオチドが付加して、末端が突出した構造の方が効果が高いことが示された (WO 02/44321)。

哺乳類細胞では、長い二本鎖RNAを導入した場合、ウイルス防御機構により遺伝子全体の発現抑制とアポトーシスが起こり、特定の遺伝子の抑制をすることができなかったが、20~29塩基のsiRNAであれば、このような反応がおこらず、特定の遺伝子の発現を抑制をすることができると見いだされた。なかでも21~25塩基のものが発現抑制効果が高い (Nature, 411, 494-498, 2001; Nat. Rev. Genet., 3, 737-747, 2002; Mol. Cell, 10, 549-561, 2002; Nat. Biotechnol., 20, 497-500, 2002)。

RNAiでは、二本鎖RNAは一本鎖アンチセンスRNAに比べ、標的遺伝子に対する発現抑制効果が飛躍的に高いことが報告されている (Nature, 391, 806-811, 1998; Mol. Cell, 10, 549-561, 2002)。また、二本鎖RNAでなく、分子内ハイブリダイズにより、ヘアピン構造を形成する一本鎖RNAも、siRNAと同様にRNAiを示すことが報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 6047-6052, 2002)。

RNAiはin vitroのみならず、in vivo試験においても多く検証されており、50bp以下のsiRNAを用いた胎児の動物での効果 (WO 02/132788)、成体マウスでの効果 (WO 03/10180) が報告されている。また、siRNAをマウス胎児に静脈内投与した場合に、腎臓、脾臓、肺、膵臓、肝臓の各臓器で発現抑制効果が確認されている (Nat. Genet. 32, 107-108, 2002)。さらに、脳細胞においてもsiRNAを直接投与することで作用することが報告されている。 (Nat. Biotechnol., 20, 1006-1010, 2002) しかし、これまでのところKLF5あるいは他のKLFファミリー遺伝子に対するsiRNAを用いたRNAiに関しては報告例がない。

発明の開示

本発明の目的はKLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを見出すことである。このようなRNAは、KLF5遺伝子の発現を抑制することにより、KLF5の転写因子としての機能を阻

害し、心血管性疾患や癌等のKLF5が病態の形成に関与する疾患に対する、副作用の少ない治療薬または予防薬に用いることができる。

本発明者らは、鋭意検討を行った結果、以下に記載する発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の(1)～(13)に関する。

- 5 (1) KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列および該配列と相補的な配列を含み、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。
 - (2) KLF5 mRNAがヒトまたはマウスのKLF5 mRNAである、(1)に記載のRNA。
 - (3) RNAが、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に1～6個のヌクレオチドを付加した二本鎖RNAである、(1)または(2)に記載のRNA。
 - 10 (4) RNAが、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列からなるRNAおよび該配列と相補的な配列からなるRNAを、スパーサーオリゴヌクレオチドでつなぎ、3'端に1～6個のヌクレオチドを付加した、ヘアピン構造を形成するRNAである、(1)または(2)に記載のRNA。
 - 15 (5) 以下の(a)～(c)からなる群から選ばれるKLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。
 - (a) 配列番号2～16のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2～4個のウリジル酸またはデオキシチミジル酸を付加した二本鎖RNA。
 - (b) 配列番号2～16のいずれか1つの配列からなるRNAおよび該配列と相補的な配列からなるRNAを2個のウリジル酸を5'端に有するスパーサーRNAでつなぎ、3'端に2～4個のウリジル酸を付加した、ヘアピン構造を形成するRNA。
 - 20 (c) 配列番号2～11のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNA。
 - (6) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAを発現するベクター。
 - 25 (7) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAまたは(6)に記載のベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5遺伝子の発現を抑制する方法。
 - (8) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAまたは(6)に記載のベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現を抑制する方法。
 - 30 (9) KLF5により転写が活性化される遺伝子が血小板由来増殖因子A鎖遺伝子または平滑筋ミオシン重鎖SMemb遺伝子である(8)に記載の方法。
 - (10) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAまたは(6)に記載のベクターを有効成分として含有する医薬組成物。
 - (11) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAまたは(6)に記載のベクターを有効成分として含有する、血管新生を阻害するための医薬組成物。
 - 35 (12) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAまたは(6)に記載のベクターを有効成分として含有する、心血管系疾患もしくは癌の治療薬または予防薬。
 - (13) 心血管系疾患が動脈硬化、冠動脈インターベンション後の再狭窄または心肥大である(12)に記載の治療薬または予防薬。
 - 40 本発明のRNAにより、KLF5遺伝子およびKLF5により転写が活性化される遺伝子の発

現を抑制することができる。本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターの投与により、KLF5遺伝子およびKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現が抑制され、平滑筋の増殖や血管新生を抑制できるので、本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターは、動脈硬化、冠動脈インターベンション後の再狭窄、心肥大等の心血管系疾患、あるいは癌の治療剤または予防剤の有効成分として使用することができる。

1. KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA

本発明のRNAは、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基、好ましくは17～25塩基、より好ましくは19～23塩基の配列（以下配列Xとする）および該配列と相補的な配列（以下、相補配列X'とする）を含み、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAである。該RNAとしては、（a）配列Xの鎖（センス鎖）および相補配列X'の鎖（アンチセンス鎖）からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に1～6個、好ましくは2～4個のヌクレオチドを付加した二本鎖RNA（以下、このような構造のRNAをsiRNAとよぶ）であってKLF5遺伝子の発現を抑制するRNA、（b）配列XからなるRNAおよび相補配列X'からなるRNAを、スパーサーオリゴヌクレオチドでつなぎ、3'端に1～6個、好ましくは2～4個のヌクレオチドを付加した、ヘアピン構造を形成するRNA（以下、このようなRNAをshRNAとよぶ）であって、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAがあげられる。これらのRNAにおいて付加するヌクレオチドの塩基はグアニン、アデニン、シトシン、チミン、ウラシルのいずれでもよく、またRNAでもDNAでもよいが、ウリジル酸（U）またはデオキシチミジル酸（dT）が好ましい。またスパーサーオリゴヌクレオチドは6～12塩基のRNAが好ましく、その5'端の配列は2個のUが好ましい。スパーサーオリゴヌクレオチドの例として、UUCAAGAGAの配列からなるRNAをあげることができる。スパーサーオリゴヌクレオチドによってつながれる2つのRNAの順番はどちらが5'側になってもよい。

配列Xは、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列、好ましくは17～25塩基、より好ましくは19～23塩基の配列であれば、いずれの配列でもよいが、以下の（1）に記載の方法で設計した19塩基の配列が最も好ましい。以上の構造を有するRNAであって、KLF5遺伝子の発現を抑制するものであれば、本発明のRNAに含まれる。

本発明のRNAは、上記の構造のRNAをKLF5遺伝子が発現している細胞に導入してKLF5遺伝子の発現を測定し、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを選択することより取得できる。

（1）配列Xの設計

遺伝子の発現を抑制したい動物のKLF5 cDNAの塩基配列から、AAではじまる21塩基の部分配列を取り出す。取り出した配列のGC含量を計算し、GC含量が20～80%、好ましくは30%～70%、より好ましくは40～60%の配列を複数個選択する。

配列は、好ましくは、コード領域内の配列で、開始コドンから75塩基以上下流の配列を選択する。KLF5 cDNAの塩基配列の情報は、GenBank等の塩基配列データベースから得ることができる。例えば、マウスKLF5 cDNAの配列はGenBank登録番号NM_009769（配列番号49）、ヒトKLF5 cDNAの配列はGenBank登録番号AF287272（配列番号50）で、配列情報が得られる。

選択した配列の5'末端のAAを除き、配列中のTをUに変えた19塩基の配列を配列Xと

する。

(2) 本発明のRNAの調製

(1) で選択した配列Xを元に、以下のようにしてRNAを調製することができる。以下には付加するオリゴヌクレオチドとして2個のUまたはdTの場合を記載するが、
5 他のヌクレオチドの場合も同様にして調製することができる。

(a) siRNAの場合

配列Xの3'端に2個のUまたはdTを付加した配列からなるRNA、および相補配列X'の
3'端に2個のUまたはdTを付加した配列からなるRNAの2本のRNAを調製する。この2
10 本のRNAは、化学合成あるいはインビトロ転写により調製できる。化学合成は、DNA
合成機を用いて行うことができる。またアンビオン (Ambion) 社、日本バイオサー
ビス株式会社、キアゲン (QIAGEN) 社等のメーカーに化学合成を依頼することもで
きる。化学合成した互いに相補的な配列を含む2本のRNAをアニーリングすること
により、配列Xの鎖および相補配列X'の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に
15 2個のUまたはdTを付加した二本鎖RNAを調製することができる。アニーリングは、
2本のRNAを適当なバッファー中で90~95℃で1~5分加熱後、45~60分間かけて室
温にまで冷却することにより行うことができる。

インビトロ転写によるRNAの調製は、以下のようにして行うことができる。まず、

(i) T7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するDNA(T7プライマー)、(ii)
相補配列X'のUをTに変え、その5'端には2個のAを付加し、3'端にはT7プライマーの
20 3'端8塩基と相補的な配列を付加した配列を有するDNA、(iii) 配列XのUをTに変え、
その5'端には2個のAを付加し、3'端にはT7プライマーの3'端8塩基と相補的な配列
を付加した配列を有するDNA、をそれぞれ調製する。

T7プライマーと(ii)のDNAとをアニールさせた後、DNAポリメラーゼ反応により、
二本鎖DNAにする。得られた二本鎖DNAを鋳型として、T7 RNAポリメラーゼを用いた
25 インビトロ転写反応を行うことにより、配列Xの3'端に2個のUが付加し、5'端には
リーダー配列が付加した配列を有するRNAを合成することができる。同様にT7プライ
マーと(iii)のDNAとを用いて同様の反応を行うことにより、相補配列X'の3'端に
2個のUが付加し、5'端にはリーダー配列が付加した配列を有するRNAを合成する
ことができる。

2つの反応液を混ぜて、さらにインビトロ転写反応を続けることにより、互いに
相補的な配列を含む2本のRNAをアニールさせる。その後、デオキシリボヌクレアー
ゼおよび一本鎖RNA特異的なリボヌクレアーゼにより、鋳型の二本鎖DNAおよび各RNA
鎖の5'側のリーダー配列を分解して除去する。各RNA鎖の3'端の2個のUは分解を受
けずに付加したまま残る。

35 以上の反応は、サイレンサーsiRNA作製キット (Silencer・siRNA Construction
Kit、アンビオン社製) 等のキットを用いて行うことができる。T7プライマーとアニ
ールさせるDNAは、DNA合成機により化学合成することができる。またアンビオン社、
日本バイオサービス株式会社、北海道システムサイエンス株式会社、キアゲン社等
のメーカーに化学合成を依頼することもできる。

(b) shRNAの場合

配列XからなるRNAおよび相補配列X'からなるRNAを、スパーサーオリゴヌクレオチドでつなぎ、3'端に1〜6個、好ましくは2〜4個のヌクレオチドを付加した、ヘアピン構造を形成するRNAは、DNA合成機を用いた化学合成によって調製できる。また、2. に後述するsiRNA発現ベクターを細胞に導入することにより、細胞内にshRNAが合成される。このshRNAは、細胞内でsiRNAに変換される。ベクターを導入して細胞内で合成させた場合は、shRNAの単離と(3)に記載した細胞への導入の操作は不要であり、ベクターを導入した細胞についてKLF5遺伝子の発現を解析すればよい。

(3) KLF5遺伝子の発現抑制

KLF5遺伝子を発現する細胞株に(2)で調製したsiRNAまたはshRNAを導入する。細胞株は、(1)の配列Xの設計のもとにしたKLF5 cDNAと同じ動物種の細胞を用いる。KLF5遺伝子を発現する細胞株としては、平滑筋、繊維芽細胞または血管内皮細胞に由来する細胞株、例えばマウス胎児繊維芽細胞株C3H/10T1/2 (ATCC番号: CCL-226)、ヒト臍帯血管内皮細胞等をあげることができる。RNAの導入は、動物細胞へのトランスフェクション用試薬、例えばポリフェクト (Polyfect) トランスフェクション試薬 (キアゲン社製)、トランスメッセンジャー (TransMessenger) トランスフェクション試薬、オリゴフェクトアミン (Oligofectamine) 試薬 (インビトロジェン社製)、リポフェクトアミン (Lipofectamine) 2000 (インビトロジェン社製) 等を利用して、これらの試薬とRNAを混合して複合体を形成させた後、細胞に添加することにより行うことができる。

本発明のRNAまたは2. で後述するsiRNA発現ベクターを導入した細胞のKLF5遺伝子の発現は、RT-PCRにより解析することができる。RNAまたはsiRNA発現ベクターを導入した細胞および導入しなかった細胞から総RNAを調製し、このRNAからcDNAを合成する。合成したcDNAを鋳型にして、KLF5遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRを行い、KLF5 cDNAに由来する増幅産物の量を、アガロースゲル電気泳動によって定量することにより、KLF5遺伝子の発現量を測定することができる。RNAまたはsiRNA発現ベクターを導入しなかった細胞のKLF5遺伝子の発現量と比較して、KLF5遺伝子の発現量が減少した細胞に導入したRNAを、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAとして選択する。

このようにして選択された、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAとしては、配列番号2〜11のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNAをあげることができる。該RNAはマウス cDNAの配列に基づいて設計されたものであり、マウスKLF5遺伝子の発現を抑制する。このうち、配列番号4、8および10の配列はそれぞれマウスとヒトのそれぞれのKLF5 mRNAで共通する配列であるので、配列番号4、8および10のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNAは、マウスKLF5遺伝子だけでなくヒトKLF5遺伝子の発現も抑制する。

(1)の配列Xの設計のもとにしたある動物種AのKLF5 cDNAと、異なる動物種BのKLF5 cDNAを配列の相同性に基づいてアライメントすることにより、動物種Aで選択

された配列Xと対応する動物種Bの配列Yを得ることができる。上記の方法で、動物種AのKLF5遺伝子の発現を抑制するRNAが得られた場合、該RNAの配列Xおよびその相補配列X'の領域をそれぞれ配列Yとその相補配列Y'に置換したRNAは、動物種BのKLF5遺伝子を抑制すると考えられる。

例えば、マウスKLF5 cDNAの配列に基づく配列番号 2、3、7、9 および11のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNAは、マウスKLF5遺伝子の発現を抑制するので、ヒト KLF5 cDNAにおいて対応する配列である配列番号12~16のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNAは、ヒトKLF5遺伝子の発現を抑制すると考えられる。

2. KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを発現するベクター

(1) プラスミドベクター

KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを発現するプラスミドベクターを、培養細胞または生体内の細胞に導入することにより、細胞内で該RNAが産生され、導入した細胞でのKLF5遺伝子の発現を抑制することができる。該ベクターは、U6プロモーターあるいはH1プロモーター等RNAポリメラーゼIIIのプロモーターを含む動物細胞用プラスミドベクター等のsiRNA発現用ベクターのプロモーターの下流に、1. で選択された配列Xおよびその相補配列X'（それぞれUはTに変換する）を、2個のTを5'端に有するスパーサー配列でつなぎ、3'端にRNAポリメラーゼIIIターミネーターとなる4~6個のTからなる配列を含むDNA（以下、KLF5 siRNA用DNAとよぶ）を挿入して作製することができる。スパーサー配列としては、2個のTを5'端に有する6~12塩基の配列が好ましく、例えば、TTCAAGAGAをあげることができる。配列Xと相補配列X'の順序は、どちらが5'側でもよい。siRNA発現用ベクターとしては、pSilencer 1.0-U6（アンピオン社製）、pSilencer 3.0（アンピオン社製）、pSUPER〔オリゴエンジン（OligoEngine）社製〕、pSIREN-DNR〔BDバイオサイエンシズ・クロンテック（BD Biosciences Clontech）社製〕等をあげることができる。

上記のKLF5 siRNA用DNAを挿入して作製した組換えベクターを導入した細胞では、U6プロモーターからのRNAポリメラーゼIII反応により、1. (1) に記載したshRNAが合成され、このshRNAが細胞内で切断を受けてsiRNAに変換される。組換えベクターの細胞への導入は、通常の動物細胞へのベクターの導入と同様に、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417, 1987）等により行うことができる。

(2) ウイルスベクター

siRNA発現ベクターとして、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター等のウイルスベクターを利用したsiRNA発現用ベクターを用いることもできる。このようなウイルスベクターを利用したsiRNA発現用ベクターとして、pSUPER.retro（オリゴエンジン社製）、pSIREN-RetroQ（BDバイオサイエンシズ・クロンテック社製）、文献（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 1844-1848, 2003; Nat. Genet., 33, 401-406, 2003）に記載のベクターなどをあげることがで

きる。

ウイルスベクターを利用したsiRNA発現用ベクターに上記と同様のKLF5 siRNA用DNAを挿入して作製した組換えベクターを、用いたウイルスベクターに応じたパッケージング細胞に導入することにより、該組換えベクターを含む組換えウイルスを生産させる。組換えベクターのパッケージング細胞への導入は、上記と同様に、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等により行うことができる。得られた組換えウイルスを細胞に接触させて感染させることにより、組換えベクターが細胞に導入され、1. (1)に記載したshRNAが合成され、このshRNAが細胞内で切断を受けてKLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAに変換される。

3. KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAの利用法

(1) KLF5により転写が活性化される遺伝子の発現の抑制

KLF5は転写因子として、種々の遺伝子の発現を活性化している。KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAにより、KLF5遺伝子の発現が抑制される結果、KLF5により転写が活性化される遺伝子の発現も抑制することができる。KLF5により転写が活性化される遺伝子としては、SMemb、PDGF-A、TGF- β 、VEGFリセプター、PAI-1、Egr-1等の遺伝子をあげることができる。

(2) KLF5の機能の解析

KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを、種々の細胞に作用させ、その細胞の形質の変化や、各種遺伝子の発現量の変動を調べることにより、それぞれの細胞におけるKLF5の機能を解析することができる。また、該RNAは、胎児から成体まで、さまざまな発育段階の動物でKLF5遺伝子の発現抑制をすることができるので、ヘテロノックアウトマウスの解析だけではわからないKLF5の機能の解明をすることが可能となる。

4. 本発明のRNAまたはベクターを有効成分として含有する医薬組成物

本発明のKLF5遺伝子の発現を特異的に抑制するRNA、または該RNAを発現するベクターを投与することにより、KLF5および、KLF5が転写を活性化する遺伝子の発現が抑制され、平滑筋の増殖や血管新生が阻害されるので、動脈硬化、冠動脈インターベンション後の再狭窄や心肥大等の心血管系の疾患あるいは癌の治療または予防をすることができる。

本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターは、医薬品として使用する場合、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される添加剤（例えば担体、賦形剤、希釈剤等）、安定化剤または製薬上必要な成分と混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。また、ウイルスベクターの場合は、組換えウイルスの形態でウイルスベクターを投与することが望ましい。

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与または経口投与をあげることができ、望ましくは静脈内投与、筋肉内投与をあげることができる。静脈内投与、筋肉内投与に適当な製剤としては、注射剤があげられる。

本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターを、注射剤の形態に成形するに際しては、担体として、たとえば、水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレン

グリコール、クエン酸、酢酸、リン酸、乳酸、乳酸ナトリウム、硫酸および水酸化ナトリウム等の希釈剤、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウムおよびリン酸ナトリウム等のpH調整剤および緩衝剤、ピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、チオグリコール酸およびチオ乳酸等の安定化剤等が使用できる。なお、この場合等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖、マンニトールまたはグリセリンを医薬製剤中に含有せしめてもよい。安定化剤としては、グルコース等の単糖類、サッカロース、マルトース等の二糖類、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール、塩化ナトリウム等の中性塩、グリシン等のアミノ酸、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体（プルロニック）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（トウイーン）等の非イオン系界面活性剤、ヒトアルブミン等が例示される。また、細胞内への取り込みを促進するため、本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターを、該RNAまたはベクターを含むリポソームとして調製して用いてもよい。

図面の簡単な説明

第1図 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 2、siRNA No. 3、siRNA No. 4、siRNA No. 5、siRNA No. 6をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、KLF5は、KLF5 mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

第2図 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 7、siRNA No. 8、siRNA No. 9、siRNA No. 10、siRNA No. 11、siRNA No. 4、siRNA No. 1をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、KLF5は、KLF5 mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

第3図 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるPDGF-A遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 7、siRNA No. 8、siRNA No. 9、siRNA No. 10、siRNA No. 11、siRNA No. 4、siRNA No. 1をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、PDGF-Aは、PDGF-A mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

第4図 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるSMemb遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 7、siRNA No. 8、siRNA No. 9、siRNA No. 10、siRNA No. 11、siRNA No. 4、siRNA No. 1をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、SMembは、SMemb mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

第5図 KLF5遺伝子特異的なsiRNAはSRF遺伝子の発現は抑制しないことを示す。左から、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 1、siRNA No. 4、siRNA No. 7、siRNA No. 9、siRNA No. 10をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、SRFは、SRF mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

第6図 siRNA No. 4によるヒトKLF5遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、およびsiRNA No. 4をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、KLFは、KLF5 mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

5 第7図 siRNA No. 4による血管内皮細胞の遊走の阻害を示す。横軸は時間（時間）、縦軸は遊走した細胞数で、●はsiRNA No. 4を導入した細胞、■はSEAP-siRNAを導入した細胞の結果を示す。エラーバーは例数4の標準偏差である。

第8図 siRNA No. 4による抗腫瘍効果を示す。横軸は時間（日数）、縦軸は腫瘍体積（mm³）で、●はKLF5 siRNA No. 4を投与したマウスの腫瘍体積、■はSEAP-siRNA
10 を投与したマウスの腫瘍体積を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

15 実施例1 siRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制

（1）siRNAの調製

20 KLF5遺伝子の発現を抑制できるsiRNAの配列として、マウスKLF5 cDNAの配列（GenBank登録番号：NM_009769、配列番号49）から、（a）AAではじまる21塩基の配列、（b）GC含量が20～80%の2つの条件に当てはまる、11個の部分配列を選択した。ただし、開始コドン（配列番号49の167～169番目の配列）より75塩基以上下流の、コード領域（配列番号167～1507番目の配列）内の配列で、GC含量が40～60%のものをなるべく選択するようにした。選択した配列の配列番号49における配列の位置、GC含量を第1表に示した。選択した配列の5'端のAAを除いた19塩基の配列のTをUに変えた配列をそれぞれ配列番号1～11に示した。

第 1 表

選択した配列	配列の位置	GC 含量	作製した RNA の配列	配列番号	siRNA 番号
AACATGAACGTCTTCTCCCT	537-556	48% (10/21)	CAUGAACGUCUCCUCCUTT	17	No. 1
			AGGGAGGAAGACGUUCAUGTT	18	
AAATTTACCTGCCACTCTGCC	1156-1176	48% (10/21)	AUUUACCUGCCACUCUGCCUU	19	No. 2
			GGCAGAGUGGCAGGUAUUUU	20	
AAGGAGTAACCCGGATCTGGA	1216-1236	52% (11/21)	GGAGUAACCCGGAUCUGGAUU	21	No. 3
			UCCAGAUCCGGGUUACUCCUU	22	
AAAAGCTCACCTGAGGACTCA	1303-1323	48% (10/21)	AAGCUCACCUGAGGACUCAUU	23	No. 4
			UGAGUCCUCAGGUGAGCUUUU	24	
AATCCCCAGACCGTCCATGCC	151-171	62% (13/21)	UCCCCAGACCGUCCAUGCCUU	25	No. 5
			GGCAUGGACGGUCUGGGGUU	26	
AACGCTGCGCCACCCGCCTG	1515-1535	76% (16/21)	CGCUGCGCCACCCGCCUGUU	27	No. 6
			CAGGCGGGUGGGCGCAGCGUU	28	
AAATGGAGAAGTATCTGACCC	405-425	43% (9/21)	AUGGAGAAGUAUCUGACCCUU	29	No. 7
			GGGUCAGAUACUUCUCCAUUU	30	
AAAGTATAGACGAGACAGTGC	463-483	43% (9/21)	AGUAUAGACGAGACAGUGCUU	31	No. 8
			GCACUGUCUCGUCUAUACUUU	32	
AAACCAGACGGCAGTAATGGA	874-894	48% (10/21)	ACCAGACGGCAGUAAUGGAUU	33	No. 9
			UCCAUUACUGCCGUCUGGCUU	34	
AAGCTCAGAGCCTGGAAGTCC	2048-2068	57% (12/21)	GCUCAGAGCCUGGAAGUCCUU	35	No. 10
			GGACUUCAGGCUCUGAGCUU	36	
AAGCCGTTCCAGTGCATGGTG	1424-1444	57% (12/21)	GCCGUUCCAGUGCAUGGUGUU	37	No. 11
			CACCAUGCACUGGAACGGCUU	38	

配列番号 1～11のいずれかの配列および該配列と相補的な配列の3'端にそれぞれ 2 個のUまたはdTを付加した配列からなる11種類の二本鎖RNA（以下、それぞれsiRNA No. 1～No. 11とよぶ）を以下のようにして調製した。siRNA No. 1～No. 11それぞれのセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列を第 1 表に示した（配列番号17～38）。siRNA No. 1は、配列番号17および18の配列からなる 2 本のRNAを、株式会社日本バイオサービスに依頼して化学合成し、アニーリングさせることにより調製した。siRNA No. 2～No. 11はサイレンサー-siRNA作製キット（Silencer™ siRNA Construction Kit、アンピオン社製）を利用したインビトロ転写により調製した。インビトロ転写の鋳型作製に用いるDNAは、北海道システム・サイエンス株式会社に化学合成を依頼した。また、文献（Nat. Genet., 32, 107-108, 2002; 米国特許出願公開 第2002/0132788号明細書）に基づき、配列番号39および40の配列からなる、分泌型アルカリフォスファターゼ（SEAP）遺伝子の発現を抑制するsiRNA（以下、SEAP-siRNAとよぶ）を、サイレンサー-siRNA作製キットを利用したインビトロ転写に

より調製し、コントロールのsiRNAとして用いた。

(2) siRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制

マウス胎児線維芽細胞株C3H/10T1/2 (入手先: アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC)、ATCC番号: CCL-226) をウェルあたり 4×10^5 個になるよう6ウェル・プレート (コーニング社製) に播種した。1.5 μg のsiRNA No. 2、No. 3、No. 4、No. 5、No. 6およびSEAP-siRNAそれぞれに、細胞内導入試薬ポリフェクト (polyfectR、キアゲン社製) 10 μL を添加して混合し、室温下5~10分保持した後、各ウェルに添加した。5%CO₂存在下37°Cで48時間から72時間インキュベーションし、細胞にそれぞれのsiRNAを導入した。

siRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制は、以下に示すRT-PCRにより確認した。インキュベーション終了後、回収した細胞から、細胞溶解液ホモジェナイズ用キットのQIAシュレッダー (QIAshredder、キアゲン社製) および総RNA精製用キットのRNイーザー (RNeasy、キアゲン社製) を用いてRNAを単離した。単離したRNAを、30~50 μL の注射用水 (大塚蒸留水、大塚製薬株式会社製) で溶解し、逆転写反応によりcDNAを合成した。逆転写反応は、上記のRNA溶液 (RNA 1.0 μg 分) と、5×緩衝液2.5 μL 、0.1 mol/L ジチオスレイトール (DTT) 2.0 μL 、20 mmol/L dNTP (ロッシュ社製) 1.0 μL 、50 $\mu\text{mol/L}$ ランダムプライマー (宝酒造株式会社製) 2.0 μL 、ヌクレアーゼ阻害剤スーパーアーズ・イン (SUPERase-In、アンビオン社製) 1.0 μL およびパワースクリプト (PowerScript) 逆転写酵素 (クロンテック社製) 1.0 μL を含む溶液1.0 μg を混合し、合計18 μL になるよう注射用水を加えた反応溶液で、42°Cで1.5時間実施した。5×緩衝液およびDTTはパワースクリプト逆転写酵素に付属のものをを用いた。

配列番号41および42の配列それぞれからなる2本のDNAを化学合成し、それぞれマウスKLF5遺伝子特異的なフォワードプライマー、リバースプライマーとした。これらのプライマーを用いたPCRにより、KLF5 cDNAから配列番号49の1268~1428番目の配列に相当する161bpの断片が増幅される。

10×PCR緩衝液2.5 μL 、2.5 mmol/L dNTP (ロッシュ製) 2.0 μL 、5 $\mu\text{mol/L}$ フォワードプライマー2.0 μL 、5 $\mu\text{mol/L}$ リバースプライマー2.0 μL 、ホットスタートタック (HotStarTaq) DNAポリメラーゼ (キアゲン社製、5単位/ μL) 0.125 μL 、18S rRNA特異的プライマー [クオンタmRNA (QuantumRNA) クラシック18S内部標準、アンビオン社製] 2 μL 、注射用水13.375 μL 、cDNA 1.0 μL からなる25 μL のPCR反応溶液を調製し、95°Cで15分保持後、熱変性94°Cで30秒間、アニーリング53°Cで30秒間、伸長反応72°Cで40秒間の反応を1サイクルとして、28サイクルのPCRを実施し、その後72°Cで10分間保持した。10×PCR 緩衝液はホットスタートタックDNAポリメラーゼに付属のものをを使用した。反応後の溶液の0.8%アガロースゲル電気泳動により、KLF5 mRNAに由来する増幅産物(161bp)を検出し、siRNAを導入しなかった細胞での増幅産物の量と比較した。内部標準として、18S rRNAに由来する増幅産物 (488bp) を用いた。第1図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではKLF5遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 2、No. 3、No. 4、No. 5およびNo. 6は、KLF5遺伝子の発現を抑制することが確認できた。中でも、

siRNA No. 3およびsiRNA No. 4は強くKLF5遺伝子の発現を抑制した。

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、siRNA No. 1、No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11を用いて、上記と同様にして、C3H/10T1/2細胞へのsiRNAの導入と、RT-PCRによるKLF5遺伝子の発現の解析を行った。第2図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではKLF5遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11は、KLF5遺伝子の発現を抑制することが確認できた。中でも、siRNA No. 4、siRNA No. 7、siRNA No. 9およびsiRNA No. 10は強くKLF5遺伝子の発現を抑制した。KLF5遺伝子に特異的であるにもかかわらず、siRNA No. 1では抑制がみられなかった。

実施例2 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによる、KLF5により転写が活性化される遺伝子の発現の抑制

(1) PDGF-A遺伝子の発現の抑制

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、siRNA No. 1、No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11をC3H/10T1/2細胞へ導入し、RT-PCRにより、KLF5により転写が活性化される遺伝子であるPDGF-A遺伝子の発現の解析を行った。

実施例1(2)と同様にして、siRNAのC3H/10T1/2細胞への導入、cDNAの調製を行った。配列番号43および44の配列からなる2本のDNAを化学合成し、それぞれPDGF-A遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーとした。これらのプライマーを用いたPCRにより、PDGF-A cDNAから403bpの断片が増幅される。PDGF-A遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーを、KLF5遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーの代わりに用いて、実施例1(2)のKLF5遺伝子の発現解析と同様にして、PDGF-A遺伝子の発現を解析した。ただしPCRは、PCR反応溶液を95℃で15分間保持後、熱変性94℃で30秒間、アニーリング53℃で30秒間、伸長反応72℃で40秒間からなる反応を1サイクルとし、26サイクル実施し、その後72℃で10分間保持する条件で行い、電気泳動は1%アガロースゲルで行った。

第3図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではPDGF-A遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11は、KLF5により転写が活性化される遺伝子であるPDGF-A遺伝子の発現をも抑制することが確認できた。中でも、siRNA No. 4、siRNA No. 7、siRNA No. 9およびsiRNA No. 10は強くPDGF-A遺伝子の発現を抑制した。KLF5遺伝子に特異的であるにもかかわらず、siRNA No. 1では抑制がみられなかった。

(2) SMemb遺伝子の発現の抑制

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、siRNA No. 1、No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11をC3H/10T1/2細胞へ導入し、RT-PCRにより、KLF5により転写が活性化される遺伝子であるSMemb遺伝子の発現の解析を行った。

実施例1(2)と同様にして、siRNAのC3H/10T1/2細胞への導入、cDNAの調製を行った。配列番号45および46の配列からなる2本のDNAを化学合成し、それぞれSMemb遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーとした。これらの

プライマーを用いたPCRにより、SMemb cDNAから235bpの断片が増幅される。SMemb遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーを、KLF5遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーの代わりに用いて、実施例1 (2) のKLF5遺伝子の発現解析と同様にして、SMemb遺伝子の発現を解析した。ただしPCRは、PCR反応溶液を95℃で15分間保持後、熱変性94℃で30秒間、アニーリング53℃で30秒間、伸長反応72℃で40秒間からなる反応を1サイクルとし、26サイクル実施し、その後72℃で10分間保持する条件で行い、電気泳動は1%アガロースゲルで行った。

第4図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではSMemb遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11は、KLF5により転写が活性化される遺伝子であるSMemb遺伝子の発現をも抑制することが確認できた。中でも、siRNA No. 4、siRNA No. 7、siRNA No. 9およびsiRNA No. 10は強くSMemb遺伝子の発現を抑制した。KLF5遺伝子に特異的であるにもかかわらず、siRNA No. 1では抑制がみられなかった。

(3) KLF5遺伝子特異的なsiRNAによる遺伝子発現の抑制の特異性

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAによる遺伝子の発現の抑制が、KLF5遺伝子およびKLF5により転写が活性化される遺伝子に特異的であることを、KLF5遺伝子に特異的なsiRNAをC3H/10T1/2細胞へ導入し、RT-PCRにより血清応答因子(SRF)遺伝子の発現を解析することにより、検証した。SRF遺伝子は平滑筋細胞で多く発現する転写因子の遺伝子であり、KLF5により転写が活性化される遺伝子ではない。

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、siRNA No. 1、No. 4、No. 7、No. 9およびNo. 10を用いて、実施例1 (2) と同様にして、siRNAをC3H/10T1/2細胞へ導入した後、RT-PCRによる遺伝子発現の解析を行った。配列番号47および48の配列からなる2本のDNAを化学合成し、それぞれSRF遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーとした。これらのプライマーを用いたPCRにより、SRF cDNAから519bpの断片が増幅される。SRF遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーを、KLF5遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーの代わりに用いて、実施例1 (2) のKLF5遺伝子の発現解析と同様にして、SRF遺伝子の発現を解析した。ただしPCRは、PCR反応溶液を95℃で15分間保持後、熱変性94℃で30秒間、アニーリング53℃で30秒間、伸長反応72℃で40秒間からなる反応を1サイクルとし、26サイクル実施し、その後72℃で10分間保持する条件で行い、電気泳動は1.2%アガロースゲルで行った。

第5図に示すように、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 1、siRNA No. 4、No. 7、No. 9およびNo. 10全てにおいて、コントロールのSEAP-siRNAと同様に、SRF遺伝子の発現の抑制がみられなかった。したがって、KLF5遺伝子に特異的なsiRNAは、非特異的に、遺伝子全体の発現を抑制するのではなく、KLF5遺伝子およびKLFにより転写の活性化をうける遺伝子の発現を特異的に抑制することが明らかとなった。

実施例3 siRNAによるヒトKLF5遺伝子の発現抑制

実施例1で作製したsiRNA No. 4は、マウス KLF5 cDNAの塩基配列(配列番号49)

の1303～1323番目の配列（AAAAGCTCACCTGAGGACTCA）をもとにしたsiRNAであり、C3H/10T1/2細胞においてマウスのKLF5遺伝子の発現を強く抑制した。しかし、このAAAAGCTCACCTGAGGACTCAの配列は、ヒトKLF5 cDNAの塩基配列（配列番号50）の1481～1501番目にも存在するため、siRNA No. 4はマウスだけでなくヒトのKLF5遺伝子の発現も抑制することが期待される。以下のようにして、siRNA No. 4がヒトKLF5遺伝子の発現も強く抑制をすることを確認した。

ヒトさい帯静脈血管内皮細胞（HUVEC、入手先：三光純薬、製品番号：CC-2517）を約 3×10^5 個となるように6 cmディッシュ（コーニング社）に播種した。200 pmolのsiRNA No. 4およびSEAP-siRNAそれぞれに、細胞内導入試薬（リポフェクトアミン2000、インビトロジェン社製）10 μ Lを添加して混合し、室温下20分保持した後、全量を各ディッシュに添加した。5% CO₂存在下37 °Cで24時間インキュベーションし、細胞にそれぞれのsiRNAを導入した。

実施例1（2）に記載した方法と同じ方法で、細胞からRNAを単離し、RT-PCRによるヒトKLF5遺伝子の発現抑制を調べた。なお、KLF遺伝子特異的なフォワードプライマー、リバープライマーとしては、実施例1で用いた配列番号41および42それぞれの配列からなるDNAを用いた。これらのプライマーを用いたPCRにより、ヒトKLF5 cDNAから配列番号50の1446～1606番目の配列に相当する161bpの断片が増幅される。反応後の溶液の0.8%アガロースゲル電気泳動により、KLF5 mRNAに由来する増幅産物（161bp）を検出し、siRNAを導入しなかった細胞での増幅産物の量と比較した。内部標準として、18S rRNAに由来する増幅産物（488bp）を用いた。第6図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではKLF5遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 4は、ヒトさい帯血管内皮細胞のKLF5遺伝子の発現を抑制していた。したがって、siRNA No. 4はマウスのKLF5遺伝子だけでなく、ヒトのKLF5遺伝子の発現も強く抑制できることが確認された。

第2表に、実施例1でマウスKLF5遺伝子の発現を抑制したsiRNA No. 2～4および7～11において、設計のもとにしたマウスKLF5 cDNA上の21塩基の配列および配列番号49におけるその位置と、該マウス配列に対応するヒトcDNA上の21塩基の配列、配列番号50におけるその位置、該ヒト配列から5'端のAAを除いたRNAの配列を表す配列番号を示した。なお、siRNA No. 5および6は、非コード領域の配列をもとにしているため、対応するヒト配列は示さなかった。これらのヒト配列をもとにした二本鎖RNAもヒトKLF5遺伝子の発現を抑制すると考えられる。なお、siRNA No. 4、8および10は、対応するヒト配列がマウス配列と全く同じであり、siRNA No. 8および10は、siRNA No. 4と同様に、マウスKLF5遺伝子だけでなくヒトKLF5遺伝子の発現を抑制すると考えられた。

第2表

siRNA 番号	マウス KLF5 cDNA		ヒト KLF5 cDNA		
	配列	位置	対応する配列	位置	配列 番号
No. 2	AAATTTACCTGCCACTCTGCC	1156-1176	AAATTTACCCACCACCCTGCC	1334-1354	12
No. 3	AAGGAGTAACCCGGATCTGGA	1216-1236	AAGGAGTAACCCCGATTGGA	1394-1414	13
No. 4	AAAAGCTCACCTGAGGACTCA	1303-1323	AAAAGCTCACCTGAGGACTCA	1481-1501	4
No. 7	AAATGGAGAAGTATCTGACCC	405-425	AAATGGAGAAGTATCTGACAC	583-603	14
No. 8	AAAGTATAGACGAGACAGTGC	463-483	AAAGTATAGACGAGACAGTGC	641-661	8
No. 9	AAACCAGACGGCAGTAATGGA	874-894	AAATCAGACAGCAGCAATGGA	1040-1060	15
No. 10	AAGCTCAGAGCCTGGAAGTCC	2048-2068	AAGCTCAGAGCCTGGAAGTCC	1226-1246	10
No. 11	AAGCCGTTCCAGTGCATGGTG	1424-1444	AAGCCCTTCCAGTGCAGGGTG	1602-1622	16

実施例4 KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAによる血管内皮細胞の遊走の阻害

KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNA No. 4の、血管内皮細胞の遊走に対する阻害を、
以下に示すような微小孔フィルターを用いた血管内皮細胞のインビトロ細胞遊走試験
(J. Cell Biol., 147, 1073-1084, 1999; Becton, Dickinson and Company, Technical Bulletin, 429, 1998) により調べた。

ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC、入手先：三光純薬、製品番号：CC-2517) を約 3×10^5 個となるように6 cmディッシュ (コーニング社) に播種した。siRNA No. 4およびコントロールのSEAP-siRNAそれぞれ200 pmolに10 μ Lの細胞内導入試薬 (リポフェクタミン2000, インビトロジェン社製) を添加、混合し、室温下20分インキュベーションした後、全量をディッシュに添加した。5% CO₂存在下37°Cで18時間インキュベーションし、siRNAを導入した。

siRNA導入細胞を洗浄後、5 μ g/mLの生細胞染色用蛍光色素 (カルセインAM、同仁化学社製) で細胞を蛍光標識した。得られた蛍光標識細胞は、トリプシンで細胞を剥離、洗浄後、細胞濃度 5×10^5 個/mLになるように血管内皮細胞用基礎培地 (EBM-2、三光純薬社製) で再懸濁した。HTSフルオロブロック個別型インサート (24ウェルプレート用ポアサイズ3 μ mインサート、BDファルコン) を24ウェルセルカルチャーインサート用プレート (BDファルコン) に取り付けした後、インサート側には蛍光標識細胞の懸濁液100 μ Lを、24ウェルプレート側には10 ng/mLのヒトVEGF (RアンドDシステムズ社製) を含有する血管内皮細胞用増殖培地 (ブレットキットEGM-2、三光純薬製) 600 μ Lをそれぞれ添加した。

添加後4時間まで、経時的にフィルターの微小孔を遊走してきた細胞をプレート底から蛍光顕微鏡で観察および撮影した。得られた画像から、画像解析ソフトウェア (Scion Image、Scion社製) を用いて、遊走細胞数を計測した。第7図に示すよ

うに、コントロールのSEAP-siRNAと比較して、KLF5遺伝子特異的なsiRNA No. 4を導入した血管内皮細胞では、遊走細胞数が低下した。したがって、KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAにより、血管内皮細胞の遊走を阻害できることが確認された。

5 実施例5 KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAのインビボでの血管新生阻害効果

KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNA No. 4のインビボでの血管新生阻害効果を、以下に示すようなマトリゲル (Matrigel) を用いたアッセイ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13612-13617, 1997; J. Biol. Chem., 277, 6667-6675, 2002) により調べた。

- 10 マトリゲル混合物は、マトリゲルマトリックス (BD バイオサイエンス製) 0.5 mL (5 mg量) にマウスVEGF [R アンド D システムズ社 (R & D Systems Inc.) 製、カタログ番号493-MV] 0.6 μ g、ウシ塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF、R アンド D システムズ社製、カタログ番号133-FB) 0.6 μ gおよびsiRNA No.4 10 μ gを加え、氷上でピペッティングにより混合して調製した。コントロールとして、siRNA No. 4
15 の代わりにSEAP-siRNAを用いたマトリゲル混合物も調製した。調製したマトリゲル混合物を6週齢のオスのC57BL/6マウスの背中の皮下に注射した。注射14日後にゲル化したマトリゲルを取り出した。取り出したマトリゲルをPBSで1回洗浄し、10%ホルムアルデヒド-PBS溶液で固定した。固定したマトリゲルを5 mm厚にカットしてパラフィンに包埋し、通常の組織学的手法を使用して切片化し、ヘマトキシリン-エ
20 オジンで染色した。染色したマトリゲル切片を顕微鏡で観察した。

- その結果、コントロールのSEAP-siRNAを加えたマトリゲルでは、マトリゲルに添加したVEGFおよびbFGFに反応して、多数の血管内皮細胞が遊走して、マトリゲル内に浸潤しているのに対し、siRNA No. 4を加えたマトリゲルではマトリゲル内への血管内皮細胞の浸潤が抑制されていた。したがってKLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNA
25 により、血管新生が阻害できることが確認された。

実施例6 KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAのインビボでの抗腫瘍効果

KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNA No. 4のインビボでの抗腫瘍効果を、以下のよう
に腫瘍の増殖抑制を指標にして調べた。

- 30 オス5週齢のC57BL/6マウスの背中の皮下に、マウスルイス肺ガン細胞株LL/2 (入手先: 大日本製薬株式会社、カタログ番号: 09-1642) を 1×10^6 個注射した。注射2日後、ルイス肺ガンが固定されているのを確認し、ガン周辺皮下にsiRNA No. 4を注射した。コントロールとしてSEAP-siRNAを同様にガン周辺に皮下投与した。siRNA No. 4およびSEAP-siRNAの投与量はマウス1匹あたり1 μ gを50 μ Lの注射用水 (大塚
35 蒸留水、大塚製薬株式会社製) で溶解したものを用い、投与期間は連続8日間、投与回数は1日1回で行った。投与開始後の腫瘍の体積を下記式 (1) を用いて算出し、腫瘍体積の増加をコントロールと比較した。

式 (1) : 腫瘍体積 (mm^3) = {腫瘍長さ(mm) \times 腫瘍幅(mm)}² / 2

- その結果、第8図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAを投与したマウスで
40 の腫瘍体積は、投与開始より増加していくのに対し、siRNA No.4を投与したマウス

の腫瘍体積の増加は投与後1日目より抑制された。したがってKLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAはインビボでの抗腫瘍効果を有し、投与により腫瘍の増殖を抑制できることが確認された。

5 「配列表フリーテキスト」

配列番号1－発明者：永井良三；眞鍋一郎；石原淳

発明者：鳥取恒彰

配列番号17－siRNA No. 1 センス鎖

配列番号18－siRNA No. 1 アンチセンス鎖

10 配列番号19－siRNA No. 2 センス鎖

配列番号20－siRNA No. 2 アンチセンス鎖

配列番号21－siRNA No. 3 センス鎖

配列番号22－siRNA No. 3 アンチセンス鎖

配列番号23－siRNA No. 4 センス鎖

15 配列番号24－siRNA No. 4 アンチセンス鎖

配列番号25－siRNA No. 5 センス鎖

配列番号26－siRNA No. 5 アンチセンス鎖

配列番号27－siRNA No. 6 センス鎖

配列番号28－siRNA No. 6 アンチセンス鎖

20 配列番号29－siRNA No. 7 センス鎖

配列番号30－siRNA No. 7 アンチセンス鎖

配列番号31－siRNA No. 8 センス鎖

配列番号32－siRNA No. 8 アンチセンス鎖

配列番号33－siRNA No. 9 センス鎖

25 配列番号34－siRNA No. 9 アンチセンス鎖

配列番号35－siRNA No. 10 センス鎖

配列番号36－siRNA No. 10 アンチセンス鎖

配列番号37－siRNA No. 11 センス鎖

配列番号38－siRNA No. 12 アンチセンス鎖

30 配列番号39－siRNA-SEAP センス鎖

配列番号40－siRNA-SEAP アンチセンス鎖

配列番号41－KLF5遺伝子特異的フォワードプライマー

配列番号42－KLF5遺伝子特異的リバープライマー

配列番号43－PDGF-A遺伝子特異的フォワードプライマー

35 配列番号44－PDGF-A遺伝子特異的リバープライマー

配列番号45－SMemb遺伝子特異的フォワードプライマー

配列番号46－SMemb遺伝子特異的リバープライマー

配列番号47－SRF遺伝子特異的フォワードプライマー

配列番号48－SRF遺伝子特異的リバープライマー

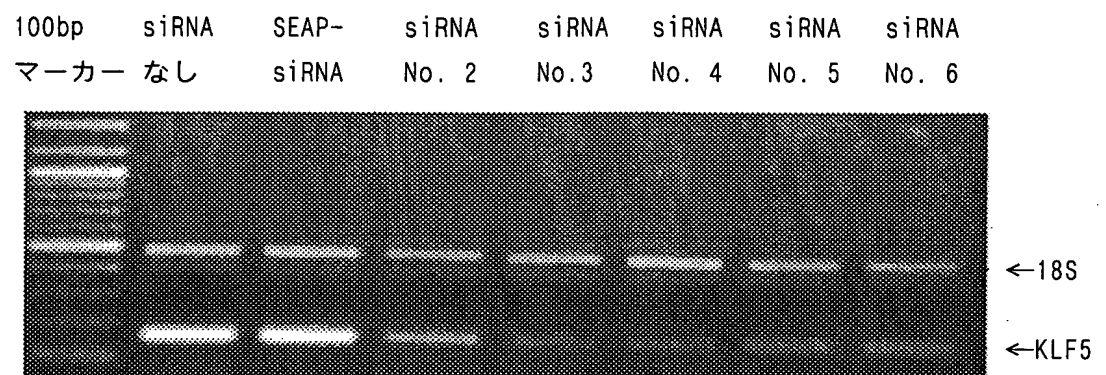
請求の範囲

1. KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列および該配列と相補的な配列を含み、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。
2. KLF5 mRNAがヒトまたはマウスのKLF5 mRNAである、請求項1に記載のRNA。
- 5 3. RNAが、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に1～6個のヌクレオチドを付加した二本鎖RNAである、請求項1または2に記載のRNA。
4. RNAが、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列からなるRNAおよび該配列と相補的な配列からなるRNAを、スパーサーオリゴヌクレオチドでつなぎ、3'端に1～6
- 10 個のヌクレオチドを付加した、ヘアピン構造を形成するRNAである、請求項1または2に記載のRNA。
5. 以下の(a)～(c)からなる群から選ばれるKLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。
 - (a) 配列番号2～16のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2～4個のウリジル酸またはデオキシチ
 - 15 ミシル酸を付加した二本鎖RNA。
 - (b) 配列番号2～16のいずれか1つの配列からなるRNAおよび該配列と相補的な配列からなるRNAを2個のウリジル酸またはデオキシチミシル酸を5'端に有するスパーサーオリゴヌクレオチドでつなぎ、3'端に2～4個のウリジル酸またはデオキシチミシル酸を付加した、ヘアピン構造を形成するRNA。
 - 20 (c) 配列番号2～11のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNA。
6. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAを発現するベクター。
7. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAまたは請求項6に記載のベクターを細胞に導入
- 25 することにより、該細胞中のKLF5遺伝子の発現を抑制する方法。
8. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAまたは請求項6に記載のベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現を抑制する方法。
9. KLF5により転写が活性化される遺伝子が血小板由来増殖因子A鎖遺伝子または平滑筋ミオシン重鎖SMemb遺伝子である請求項8に記載の方法。
- 30 10. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAまたは請求項6に記載のベクターを有効成分として含有する医薬組成物。
11. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAまたは請求項6に記載のベクターを有効成分として含有する、血管新生を阻害するための医薬組成物。
- 35 12. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAまたは請求項6に記載のベクターを有効成分として含有する、心血管系疾患もしくは癌の治療薬または予防薬。
13. 心血管系疾患が動脈硬化、冠動脈インターベンション後の再狭窄または心肥大である請求項12に記載の治療薬または予防薬。

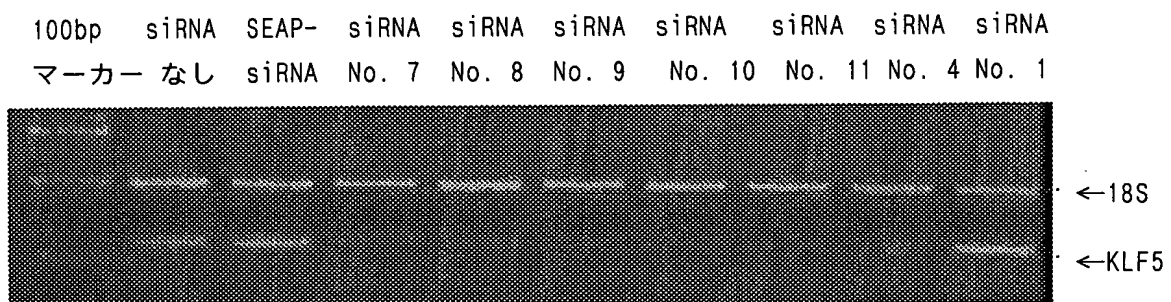
要 約 書

クルッペル様因子 5 (KLF5) cDNAの塩基配列から設計した、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列および該配列を含みKLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。特に、配列番号 2 ～16のいずれか 1 つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3' 端に 2 個のウリジル酸を付加した二本鎖RNA。該RNAまたは該RNAを発現するベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5遺伝子の発現を抑制することができる。該RNAまたは該RNAを発現するベクターは、心血管系疾患または癌の治療薬に用いることができる。

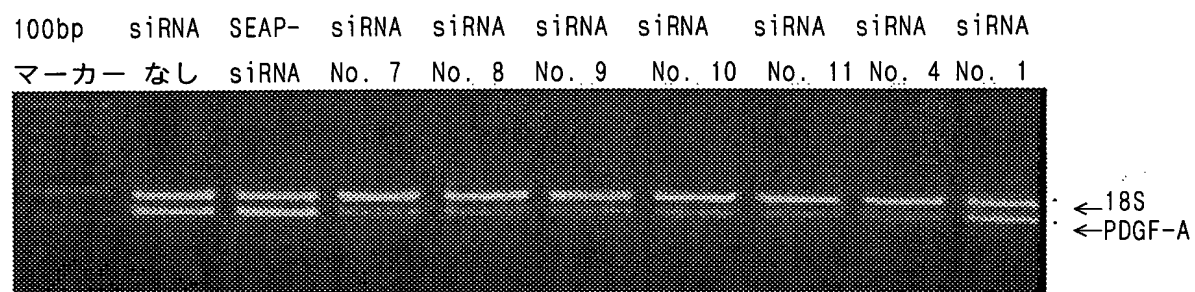
第 1 図



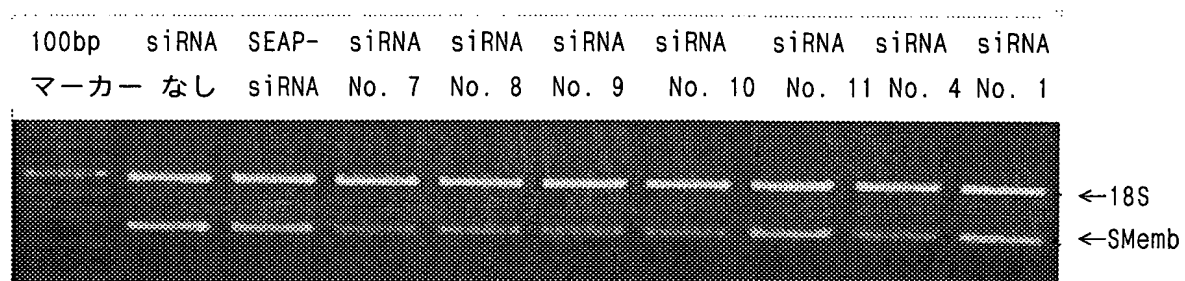
第2図



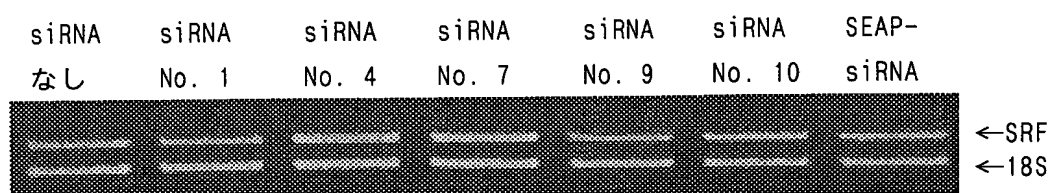
第3図



第4図

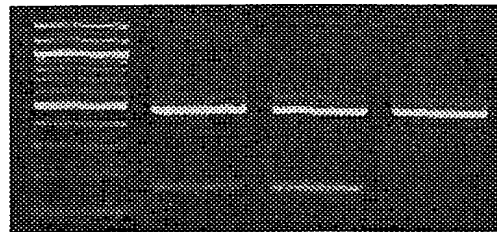


第 5 図



第6図

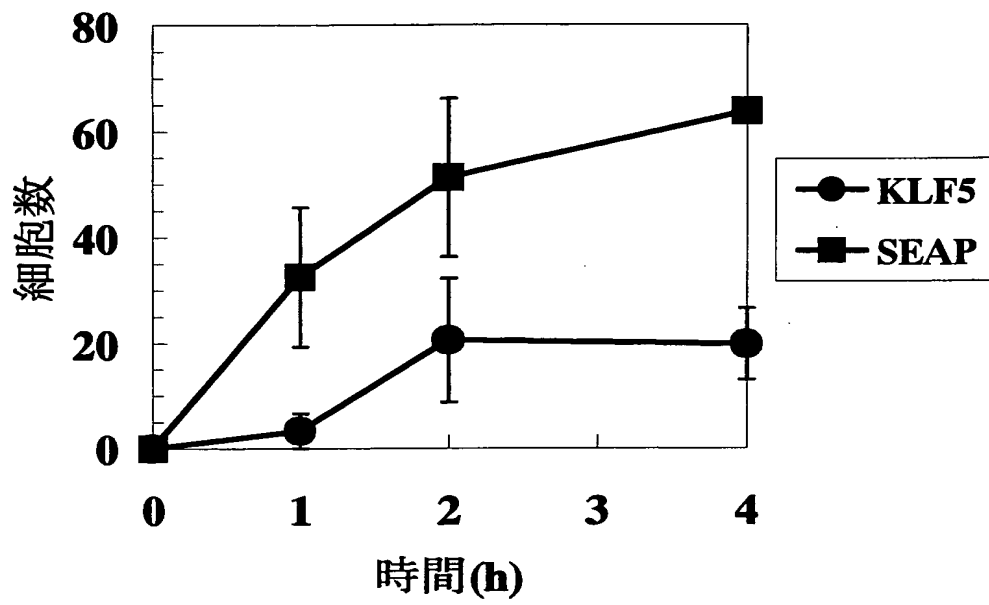
100bp	siRNA	SEAP-	siRNA
マーカー	なし	siRNA	No. 4



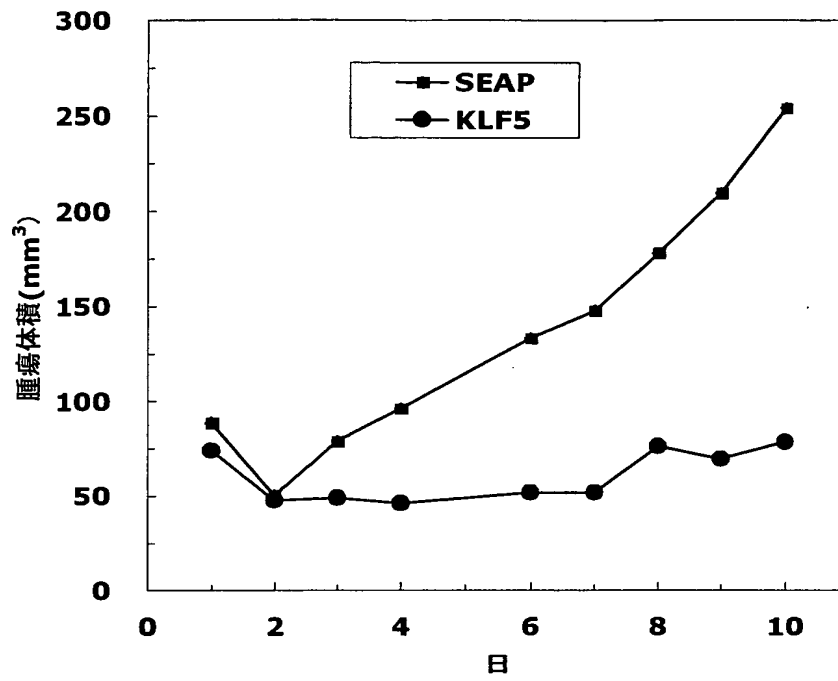
18S

KLF5

第 7 図



第8図



SEQUENCE LISTING

<110> Nagai, Ryoza; Manabe, Ichiro; Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

<120> RNAs which inhibit KLF5 gene expression

<130> 1596

<150> JP 2003-202863

<151> 2003-07-29

<150> JP 2004-075115

<151> 2004-03-16

<160> 50

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> Inventor: Nagai, Ryoza; Manabe, Ichiro; Ishihara, Atsushi;
Inventor: Tottori, Tsuneaki

<400> 1

caugaacguc uuccuccu

19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 2

auuuaccugc cacucugcc

19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 3

ggaguaaccc ggaucugga

19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 4
aagcucaccu gaggacuca 19

<210> 5
<211> 19
<212> RNA
<213> Mus musculus

<400> 5
uccccagacc guccaugcc 19

<210> 6
<211> 19
<212> RNA
<213> Mus musculus

<400> 6
cgcugcgccc acccgccug 19

<210> 7
<211> 19
<212> RNA
<213> Mus musculus

<400> 7
auggagaagu aucugaccc 19

<210> 8
<211> 19
<212> RNA
<213> Mus musculus

<400> 8
aguauagacg agacagugc 19

<210> 9
<211> 19
<212> RNA
<213> Mus musculus

<400> 9
accagacggc aguaaugga 19

<210> 10
<211> 19
<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 10

gcucagagcc uggaagucc

19

<210> 11

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 11

gccguuccag ugcauggug

19

<210> 12

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

auuuaccac caccugcc

19

<210> 13

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

ggaguaaccc cgauuugga

19

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

auggagaagu aucugacac

19

<210> 15

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

aucagacagc agcaaugga

19

<210> 16

<211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 16
 gcccuuccag ugcggggug 19

 <210> 17
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA No. 1 sense strand

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> DNA

 <400> 17
 caugaacguc uuccucccut t 21

 <210> 18
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA No. 1 antisense strand

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> DNA

 <400> 18
 agggaggaag acguucaugt t 21

 <210> 19
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA No. 2 sense strand

 <400> 19
 auuuaccugc cacucugccu u 21

<210> 20
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 2 antisense strand

<400> 20
ggcagagugg cagguaaaau u

21

<210> 21
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 3 sense strand

<400> 21
ggaguaaccc ggaucuggau u

21

<210> 22
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA #3 antisense strand

<400> 22
uccagaucgc gguuacuccu u

21

<210> 23
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 4 sense strand

<400> 23
aagcucaccu gaggacucau u

21

<210> 24
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
 <223> siRNA No. 4 antisense strand

 <400> 24
 ugaguccuca ggugagcuu u 21

 <210> 25
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA No. 5 sense strand

 <400> 25
 uccccagacc guccaugccu u 21

 <210> 26
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA No. 5 antisense strand

 <400> 26
 ggcauggacg gucugggggu u 21

 <210> 27
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA No. 6 sense strand

 <400> 27
 cgcugcgccc acccgccugu u 21

 <210> 28
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA No. 6 antisense strand

 <400> 28
 caggcgggug ggcgagcgu u 21

<210> 29
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA No. 7 sense strand

 <400> 29
 auggagaagu aucugacccu u 21

<210> 30
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA No. 7 antisense strand

 <400> 30
 gggucagaua cuucuccauu u 21

<210> 31
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA No. 8 sense strand

 <400> 31
 aguauagacg agacagugcu u 21

<210> 32
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA No. 8 antisense strand

 <400> 32
 gcacugucuc gucuauacuu u 21

<210> 33
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 9 sense strand

<400> 33

accagacggc aguaauggau u

21

<210> 34

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 9 antisense strand

<400> 34

uccauuacug ccgucuggcu u

21

<210> 35

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 10 sense strand

<400> 35

gcucagagcc uggaaguuccu u

21

<210> 36

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 10 antisense strand

<400> 36

ggacuuccag gcucugagcu u

21

<210> 37

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 11 sense strand

<400> 37
 gccguuccag ugcauggugu u 21

<210> 38
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA No. 11 antisense strand

<400> 38
 caccaugcac uggaacggcu u 21

<210> 39
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> SEAP-siRNA sense strand

<400> 39
 agggcaacuu ccagaccuu u 21

<210> 40
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> SEAP-siRNA antisense strand

<400> 40
 auggucugga aguugccuu u 21

<210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> KLF5 gene specific forward primer

<400> 41
 ggttgcaaa aagtttatac 20

<210> 42

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> KLF5 gene specific riverse primer

 <400> 42
 ggcttggcgc ccgtgtgctt cc 22

<210> 43
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> PDGF-A gene specific forward primer

 <400> 43
 ctccagcgac tcttggagat ag 22

<210> 44
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> PDGF-A gene specific riverse primer

 <400> 44
 ttcaggttgg aggtcgaca tg 22

<210> 45
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> SMemb gene specific forward primer

 <400> 45
 aatgcccgcc agcagctgga ggcac 25

<210> 46
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>

<223> SMemb gene specific riverse primer

<400> 46

gctccttata ctgatccgca tgccg

25

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SRF gene specific forward primer

<400> 47

tggcaccagt gtctgctact gtcag

25

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SRF gene specific riverse primer

<400> 48

gctgccctat cacagccatc tgggtg

25

<210> 49

<211> 1591

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (167)..(1507)

<223>

<400> 49

ccgagcccag gagccccgat ctccgtgccc gccttcgtga gcgtctggct gccggcccag

60

gggtcccccg ccgcggcccc ccgcgcagtc cgccgtcccg tgccagcccc agcgaggtgg

120

gategcgate gctccgtgtc ccgctcccg aatccccaga ccgtcc atg ccc acg

175

Met Pro Thr

1

cgg gtg ctg acc atg agc gcc cgc ctg gga cca ctg ccc cag ccg ccg

223

Arg Val Leu Thr Met Ser Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro Gln Pro Pro

5

10

15

gcc gcg cag gcc gag ccc gtg ttc gcg cag ctc aag ccg gtg ctg ggc Ala Ala Gln Ala Glu Pro Val Phe Ala Gln Leu Lys Pro Val Leu Gly 20 25 30 35	271
gct gcg aac ccg gcc cgc gac gcg gcg ctc ttc tcc gga gac gat ctg Ala Ala Asn Pro Ala Arg Asp Ala Ala Leu Phe Ser Gly Asp Asp Leu 40 45 50	319
aaa cac gcg cac cac cac ccc cct gcg ccg ccg cca gcc gct ggc ccg Lys His Ala His His His Pro Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Gly Pro 55 60 65	367
cga ctg ccc tcg gag gag ctg gtc cag aca aga tgt gaa atg gag aag Arg Leu Pro Ser Glu Glu Leu Val Gln Thr Arg Cys Glu Met Glu Lys 70 75 80	415
tat ctg acc cct cag ctc cct cca gtt ccg ata att tca gag cat aaa Tyr Leu Thr Pro Gln Leu Pro Pro Val Pro Ile Ile Ser Glu His Lys 85 90 95	463
aag tat aga cga gac agt gcc tca gtg gta gac cag ttc ttc act gac Lys Tyr Arg Arg Asp Ser Ala Ser Val Val Asp Gln Phe Phe Thr Asp 100 105 110 115	511
act gaa ggc ata cct tac agc atc aac atg aac gtc ttc ctc cct gac Thr Glu Gly Ile Pro Tyr Ser Ile Asn Met Asn Val Phe Leu Pro Asp 120 125 130	559
atc act cac ctg aga act ggc ctc tac aaa tcc cag aga cca tgc gta Ile Thr His Leu Arg Thr Gly Leu Tyr Lys Ser Gln Arg Pro Cys Val 135 140 145	607
aca cag atc aag aca gaa cct gtt acc att ttc agc cac cag agc gag Thr Gln Ile Lys Thr Glu Pro Val Thr Ile Phe Ser His Gln Ser Glu 150 155 160	655
tcg acg gcc cct cct cct cct ccg gcc ccc acc cag gct ctc ccc gag Ser Thr Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Thr Gln Ala Leu Pro Glu 165 170 175	703
ttc act agt atc ttc agc tcc cac cag acc aca gcg cca cca cag gag Phe Thr Ser Ile Phe Ser Ser His Gln Thr Thr Ala Pro Pro Gln Glu 180 185 190 195	751
gtg aac aat atc ttc atc aaa caa gaa ctt cct ata cca gat ctt cat Val Asn Asn Ile Phe Ile Lys Gln Glu Leu Pro Ile Pro Asp Leu His 200 205 210	799
ctc tct gtc cct tcc cag cag ggc cac ctg tac cag ctg ttg aat aca Leu Ser Val Pro Ser Gln Gln Gly His Leu Tyr Gln Leu Leu Asn Thr 215 220 225	847
ccg gat cta gac atg ccc agt tcg aca aac cag acg gca gta atg gac	895

Pro	Asp	Leu	Asp	Met	Pro	Ser	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Met	Asp	
		230					235					240				
acc	ctt	aat	gtt	tct	atg	gca	ggc	ctt	aac	cca	cac	ccc	tct	gct	gtt	943
Thr	Leu	Asn	Val	Ser	Met	Ala	Gly	Leu	Asn	Pro	His	Pro	Ser	Ala	Val	
	245					250					255					
cca	cag	acg	tca	atg	aaa	cag	ttc	cag	ggc	atg	ccc	cct	tgc	acg	tac	991
Pro	Gln	Thr	Ser	Met	Lys	Gln	Phe	Gln	Gly	Met	Pro	Pro	Cys	Thr	Tyr	
260					265					270					275	
acc	atg	cca	agt	cag	ttt	ctt	cca	cag	cag	gcc	act	tat	ttt	ccc	ccg	1039
Thr	Met	Pro	Ser	Gln	Phe	Leu	Pro	Gln	Gln	Ala	Thr	Tyr	Phe	Pro	Pro	
				280					285					290		
tca	cca	cca	agc	tca	gag	cct	gga	agt	ccc	gat	aga	caa	gct	gag	atg	1087
Ser	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Pro	Gly	Ser	Pro	Asp	Arg	Gln	Ala	Glu	Met	
			295					300					305			
ctg	cag	aat	ctc	acc	cca	cct	ccg	tcc	tat	gcc	gct	aca	att	gct	tcc	1135
Leu	Gln	Asn	Leu	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ile	Ala	Ser	
		310					315					320				
aaa	ctg	gcg	att	cac	aac	cca	aat	tta	cct	gcc	act	ctg	cca	gtt	aat	1183
Lys	Leu	Ala	Ile	His	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Ala	Thr	Leu	Pro	Val	Asn	
	325					330					335					
tcg	cca	act	ctc	cca	cct	gtc	aga	tac	aac	aga	agg	agt	aac	ccg	gat	1231
Ser	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Val	Arg	Tyr	Asn	Arg	Arg	Ser	Asn	Pro	Asp	
340					345					350					355	
ctg	gag	aag	cga	cgt	atc	cac	ttc	tgc	gat	tat	aat	ggt	tgc	aca	aaa	1279
Leu	Glu	Lys	Arg	Arg	Ile	His	Phe	Cys	Asp	Tyr	Asn	Gly	Cys	Thr	Lys	
			360						365					370		
gtt	tat	aca	aag	tcg	tct	cac	tta	aaa	gct	cac	ctg	agg	act	cat	acg	1327
Val	Tyr	Thr	Lys	Ser	Ser	His	Leu	Lys	Ala	His	Leu	Arg	Thr	His	Thr	
			375					380					385			
ggc	gag	aag	ccc	tac	aag	tgc	acc	tgg	gag	ggc	tgc	gac	tgg	agg	ttt	1375
Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Lys	Cys	Thr	Trp	Glu	Gly	Cys	Asp	Trp	Arg	Phe	
		390					395					400				
gcc	cgg	tcg	gat	gag	ctg	acc	cgc	cac	tac	agg	aag	cac	acg	ggc	gcc	1423
Ala	Arg	Ser	Asp	Glu	Leu	Thr	Arg	His	Tyr	Arg	Lys	His	Thr	Gly	Ala	
	405					410					415					
aag	ccg	ttc	cag	tgc	atg	gtg	tgc	caa	cgc	agc	ttc	tcc	cgc	tcc	gac	1471
Lys	Pro	Phe	Gln	Cys	Met	Val	Cys	Gln	Arg	Ser	Phe	Ser	Arg	Ser	Asp	
420					425					430					435	
cac	ctc	gcg	ctg	cac	atg	aag	cgc	cac	cag	aac	tga	gcgagcgaac				1517
His	Leu	Ala	Leu	His	Met	Lys	Arg	His	Gln	Asn						

gctgcgccca cccgcctgac gccttgcagt ccgctttgcc atcctttaaa ccgcagacct 1577
 aacttcataa aaag 1591

<210> 50
 <211> 3359
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (312)..(1685)

<400> 50
 ggtacgtgcg ctgcggttc tctcgcgag gtccggtg gcgggagcgg gctccggaga 60
 gcctgagagc acggtggggc ggggcgggag aaagtggccg cccggaggac gttggcgttt 120
 acgtgtggaa gagcggaaga gttttgcttt tcgtgcgcgc ctccgaaaac tgcctgccgc 180
 tgtctgagga gtccaccga aacctcccct cctccgcccg cagccccgcg ctgagctcgc 240
 cgacccaagc cagcgtgggc gaggtgggaa gtgcgcccga cccgcgcctg gagctgcgcc 300
 cccgagtgcc c atg gct aca agg gtg ctg agc atg agc gcc cgc ctg gga 350
 Met Ala Thr Arg Val Leu Ser Met Ser Ala Arg Leu Gly
 1 5 10
 ccc gtg ccc cag ccg ccg gcg ccg cag gac gag ccg gtg ttc gcg cag 398
 Pro Val Pro Gln Pro Pro Ala Pro Gln Asp Glu Pro Val Phe Ala Gln
 15 20 25
 ctc aag ccg gtg ctg ggc gcc gcg aat ccg gcc cgc gac gcg gcg ctc 446
 Leu Lys Pro Val Leu Gly Ala Ala Asn Pro Ala Arg Asp Ala Ala Leu
 30 35 40 45
 ttc ccc ggc gag gag ctg aag cac gcg cac cac cgc ccg cag gcg cag 494
 Phe Pro Gly Glu Glu Leu Lys His Ala His His Arg Pro Gln Ala Gln
 50 55 60
 ccc gcg ccc gcg cag gcc ccg cag ccg gcc cag ccg ccc gcc acc ggc 542
 Pro Ala Pro Ala Gln Ala Pro Gln Pro Ala Gln Pro Pro Ala Thr Gly
 65 70 75
 ccg cgg ctg cct cca gag gac ctg gtc cag aca aga tgt gaa atg gag 590
 Pro Arg Leu Pro Pro Glu Asp Leu Val Gln Thr Arg Cys Glu Met Glu
 80 85 90
 aag tat ctg aca cct cag ctt cct cca gtt cct ata att cca gag cat 638
 Lys Tyr Leu Thr Pro Gln Leu Pro Pro Val Pro Ile Ile Pro Glu His

95	100	105	
aaa aag tat aga cga gac agt gcc tca gtc gta gac cag ttc ttc act			686
Lys Lys Tyr Arg Arg Asp Ser Ala Ser Val Val Asp Gln Phe Phe Thr			
110	115	120	125
gac act gaa ggg tta cct tac agt atc aac atg aac gtc ttc ctc cct			734
Asp Thr Glu Gly Leu Pro Tyr Ser Ile Asn Met Asn Val Phe Leu Pro			
	130	135	140
gac atc act cac ctg aga act ggc ctc tac aaa tcc cag aga ccg tgc			782
Asp Ile Thr His Leu Arg Thr Gly Leu Tyr Lys Ser Gln Arg Pro Cys			
	145	150	155
gta aca cac atc aag aca gaa cct gtt gcc att ttc agc cac cag agt			830
Val Thr His Ile Lys Thr Glu Pro Val Ala Ile Phe Ser His Gln Ser			
	160	165	170
gaa acg act gcc cct cct ccg gcc ccg acc cag gcc ctc cct gag ttc			878
Glu Thr Thr Ala Pro Pro Ala Pro Thr Gln Ala Leu Pro Glu Phe			
	175	180	185
acc agt ata ttc agc tca cac cag acc gca gct cca gag gtg aac aat			926
Thr Ser Ile Phe Ser Ser His Gln Thr Ala Ala Pro Glu Val Asn Asn			
190	195	200	205
att ttc atc aaa caa gaa ctt cct aca cca gat ctt cat ctt tct gtc			974
Ile Phe Ile Lys Gln Glu Leu Pro Thr Pro Asp Leu His Leu Ser Val			
	210	215	220
cct acc cag cag ggc cac ctg tac cag cta ctg aat aca ccg gat cta			1022
Pro Thr Gln Gln Gly His Leu Tyr Gln Leu Leu Asn Thr Pro Asp Leu			
	225	230	235
gat atg ccc agt tct aca aat cag aca gca gca atg gac act ctt aat			1070
Asp Met Pro Ser Ser Thr Asn Gln Thr Ala Ala Met Asp Thr Leu Asn			
	240	245	250
gtt tct atg tca gct gcc atg gca ggc ctt aac aca cac acc tct gct			1118
Val Ser Met Ser Ala Ala Met Ala Gly Leu Asn Thr His Thr Ser Ala			
	255	260	265
gtt ccg cag act gca gtg aaa caa ttc cag ggc atg ccc cct tgc aca			1166
Val Pro Gln Thr Ala Val Lys Gln Phe Gln Gly Met Pro Pro Cys Thr			
270	275	280	285
tac aca atg cca agt cag ttt ctt cca caa cag gcc act tac ttt ccc			1214
Tyr Thr Met Pro Ser Gln Phe Leu Pro Gln Gln Ala Thr Tyr Phe Pro			
	290	295	300
ccg tca cca cca agc tca gag cct gga agt cca gat aga caa gca gag			1262
Pro Ser Pro Pro Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Asp Arg Gln Ala Glu			
	305	310	315

atg ctc cag aat tta acc cca cct cca tcc tat gct gct aca att gct	1310
Met Leu Gln Asn Leu Thr Pro Pro Pro Ser Tyr Ala Ala Thr Ile Ala	
320 325 330	
tct aaa ctg gca att cac aat cca aat tta ccc acc acc ctg cca gtt	1358
Ser Lys Leu Ala Ile His Asn Pro Asn Leu Pro Thr Thr Leu Pro Val	
335 340 345	
aac tca caa aac atc caa cct gtc aga tac aat aga agg agt aac ccc	1406
Asn Ser Gln Asn Ile Gln Pro Val Arg Tyr Asn Arg Arg Ser Asn Pro	
350 355 360 365	
gat ttg gag aaa cga cgc atc cac tac tgc gat tac cct ggt tgc aca	1454
Asp Leu Glu Lys Arg Arg Ile His Tyr Cys Asp Tyr Pro Gly Cys Thr	
370 375 380	
aaa gtt tat acc aag tct tct cat tta aaa gct cac ctg agg act cac	1502
Lys Val Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His	
385 390 395	
act ggt gaa aag cca tac aag tgt acc tgg gaa ggc tgc gac tgg agg	1550
Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Thr Trp Glu Gly Cys Asp Trp Arg	
400 405 410	
ttc gcg cga tcg gat gag ctg acc cgc cac tac cgg aag cac aca ggc	1598
Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly	
415 420 425	
gcc aag ccc ttc cag tgc ggg gtg tgc aac cgc agc ttc tcg cgc tct	1646
Ala Lys Pro Phe Gln Cys Gly Val Cys Asn Arg Ser Phe Ser Arg Ser	
430 435 440 445	
gac cac ctg gcc ctg cat atg aag agg cac cag aac tga gcaactgcccg	1695
Asp His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Gln Asn	
450 455	
tgtgaccgt tccaggtccc ctgggctccc tcaaatagaca gacctaaacta ttcctgtgta	1755
aaaacaacaa aaacaaaaaa aaaacaagaa aaccacaact aaaactggaa atgtatatatt	1815
tgtatatattg agaaaacagg gaatacattg tattaatacc aaagtgtttg gtcattttta	1875
gaatctggaa tgcttgctgt aatgtatatg gctttactca agcagatctc atctcatctc	1935
atgacaggca gccagttctca acatgggttaa ggggtggggg tgaaggggag tgtgtgcagc	1995
gtttttacct aggcaccatc atttaaatgtg acagtgttca gtaaacaacat cagttggcag	2055
gcaccagaag aagaatggat tgtatgtcaa gattttactt ggcattgagt agtttttttc	2115
aatagtaggt aattccttag agatacagta tacctggcaa ttcacaaata gccattgaac	2175

aaatgtgtgg gtttttaaaa attatataca tatatgagtt gcctatatatt gctattcaaa	2235
attttgtaaa tatgcaaato agctttatag gtttattaca agtttttttag gattcttttg	2295
gggaagagtc ataattcttt tgaaaataac catgaataca cttacagtta ggatttgtgg	2355
taaggtacct ctcaacatta ccaaaatcat ttcttttagag ggaaggaata atcattcaaa	2415
tgaactttta aaaagcaaatt ttcatgcact gattaaaata ggattatttt aaatacaaaa	2475
ggcattttat atgaattata aactgaagag cttaaagata gttacaaaat acaaaagttc	2535
aacctcttac aataagctaa acgcaatgtc attttttaaaa agaaggactt aggggtcgtt	2595
ttcacatatg acaatgttgc atttatgatg cagttttcaa gtacccaaac gttgaattga	2655
tgatgcagtt ttcatatatc gagatgttcg ctctgtcagt actgttggtt aaatgacaat	2715
ttatgtggat tttgcatgta atacacagtg agacacagta attttatcta aattacagtg	2775
cagtttagtt aatctattaa tactgactca gtgtctgcct ttaaataata atgatatgtt	2835
gaaaacttaa ggaagcaaatt gctacatata tgcaatataa aatagtaatg tgatgctgat	2895
gctgttaacc aaagggcaga ataaataagc aaaatgccaa aaggggtcctt aattgaaatg	2955
aaaatttaat tttgttttta aaatattggt tatctttatt tattttgttg taatatagta	3015
agttttttta gaagacaatt ttcataactt gataaattat agttttgttt gttagaaaag	3075
ttgctcttaa aagatgtaaa tagatgacaa acgatgtaaa taattttgta agaggcttca	3135
aaatgtttat acgtggaaac acacctacat gaaaagcaga aatcggttgc tgttttgctt	3195
ctttttccct cttatttttg tattgtggtc atttcctatg caaataatgg agcaaacagc	3255
tgtatagttg tagaattttt tgagagaatg agatgtttat atattaacga caattttttt	3315
tttggaanaa aaaaagtgcc taaaagaaaa aaaaaaaaaa aaaa	3359